



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA VOLUNTÁRIA – PICVOL

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO GENÉTICO rs662 (gene PON1) EM
TRABALHADORES RURAIS**

Área do conhecimento: Ciências da Saúde
Subárea do conhecimento: Análise toxicológica
Especialidade do conhecimento: Análise genética

Relatório Final
08/2017 a 07/2018

PICVOL

Orientador: Profa. Dra. Claudia Cristina Kaiser Pinto
Autor: Cibeles Macedo Santos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	04
2. Objetivos	09
3. Metodologia	09
4. Resultados e discussões	11
5. Conclusões	14
6. Perspectivas	14
7. Referências bibliográficas	15
8. Outras atividades	23



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

RESUMO

O uso de pesticidas na lavoura oferece riscos à saúde dos agricultores. Essa consequência está relacionado ao uso do organofosforados (OF), que podem levar a intoxicações a curto e longo prazo, especialmente no sistema neuropsicológico. As paraoxanases, em especial a PON1, tem como uma das funções a metabolização dos OFs e impedir que estes exerçam ação sobre as colinesterases. **Objetivo:** Analisar o polimorfismo genético rs662(gene PON1) em trabalhadores rurais dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim-SE **Metodologia:** A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência do SNP foi o PCR em tempo real. A primeira etapa, a extração e purificação do DNA foi realizada pela técnica de micropartículas magnéticas, através de automação, com o equipamento m2000 sp da ABBOTT®. Posteriormente, foi realizada a genotipagem das amostras, utilizando primers e sondas específicos para o SNP pesquisado. **Resultados:** Foram genotipados 413 trabalhadores rurais. O polimorfismo no gene da PON1 (rs662) apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi encontrado como alelo mais frequente o alelo T, se apresentando em heterozigose para a maioria do grupo estudo (48,4%). A atividade da BChE foi demonstrada e foi relacionada com os genótipos, essa foi estatisticamente significativa para o rs662 (gene PON1), no modelo recessivo. **Conclusão:** Os resultados de frequência alélica encontrados no presente estudo reforçam a hipótese do caráter dominante do alelo T, em outras populações estudadas.

Palavras-chave: Organofosforados, Polimorfismo, Paraoxanases



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde dos trabalhadores e para o meio ambiente. Utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agrário. A citricultura é apontada como uma das culturas que mais utiliza pesticida no Brasil, consumindo cerca de 4,0% do total dos insumos aplicados nos diversos cultivos da agricultura nacional (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2006).

São consideradas expostas a agrotóxicos todas as pessoas que entram em contato com esses produtos em função de suas atividades laborais, através do meio ambiente, da utilização doméstica ou acidental. Em todas as situações poderão ser observadas, ou não, alterações subclínicas, clínicas e laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos (Ministério da Saúde - BRASIL, 1997). A exposição ocupacional é caracterizada no momento da anamnese ocupacional, no acolhimento dos serviços de saúde do SUS, ocasião em que deve ser definido o contato do trabalhador com produtos agrotóxicos sejam em atividades de produção nas indústrias de síntese, ou na utilização como veneno em controle de pragas urbanas e rurais e de armazenamento, manuseio, transporte e destinação final dos produtos e de suas embalagens.

Os pesticidas, principalmente quando usados excessivamente, de maneira inadequada e sem orientação, além de oferecerem riscos à saúde do trabalhador rural e ao ambiente, podem causar prejuízos à saúde da população em geral, em razão das intoxicações causadas pela ingestão de alimentos e de água contaminados (LOPES, 2006).

A via ocupacional se relaciona à contaminação dos indivíduos que manipulam os pesticidas. Esta contaminação pode ocorrer tanto no processo de



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

formulação (mistura e/ou diluição dos pesticidas para uso), quanto durante o manuseio (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos pulverizadores, descarte de resíduos e embalagens contaminadas, lavagem de equipamentos e destinação de vestimentas contaminadas) e durante a colheita (onde os indivíduos entram em contato com o produto contaminado) (DYMINSKI, 2006).

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de consequências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Pode causar diversos efeitos sobre a saúde, algumas vezes fatais. A exposição ocupacional e/ou ambiental pode originar intoxicações agudas ou crônicas. São consideradas agudas quando os sintomas surgem rapidamente, poucas horas após a exposição excessiva e por curto período, a produtos que são extremamente tóxicos, podendo ocorrer de forma leve, moderada ou grave e com sinais claros e objetivos: náuseas, vômitos, convulsões, contrações musculares, dores de cabeça, desmaios, sangramentos nasais, convulsões, mal estar, sonolência, fraqueza, dor de estômago e dificuldade em respirar. Já as intoxicações crônicas são caracterizadas pelo surgimento tardio dos sintomas: dermatites de contato, lesões renais e hepáticas, alterações hematológicas, efeitos neurotóxicos retardados, alterações nos cromossomos, doença de Parkinson, cânceres e teratogêneses (DOMINGUES, et al. 2004; STOPELLI, 2005).

Entre os agrotóxicos que mais causam preocupação em termos de saúde humana, por serem os mais utilizados, estão os compostos pertencentes à categoria dos organofosforados que são inibidores da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase com variado grau de toxicidade em seres humanos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2006), são permitidos para uso na citricultura pesticidas de vários grupos químicos, sendo os mais utilizados os organofosforados, organoclorados e carbamatos. Os compostos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

organofosforados são lipossolúveis, o que faz com que se acumulem nos organismos vivos, portanto, altamente tóxicos e agem principalmente inibindo a enzima colinesterase, impedindo a passagem de novos impulsos nervosos. Constituem uma importante classe de inseticidas, representados por compostos como: o dimetoato, o metamidófos e o acefato. No ambiente, são facilmente degradados (SANCHES, et al., 2003). Intoxicações por esses compostos podem acarretar diversas alterações sendo a principal e de maior risco ao homem a alteração neuropsicológica.

Os pesticidas são considerados a segunda causa de intoxicação no Brasil, ficando abaixo apenas das intoxicações por medicamentos. A principal causa de contaminação por pesticidas é decorrente da contaminação dos aplicadores, seguida de suicídio e contaminação acidental (ANDREOLI, et al. 2000). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mostram que ocorrem anualmente cerca de 3 milhões de intoxicações agudas por pesticidas, com 220 mil mortes e 750 mil resultando em intoxicação crônicas, câncer, problemas neurológicos e outras doenças. Das intoxicações agudas, cerca de 70% ocorrem em países do chamado Terceiro Mundo, isto é, 2,1 milhões acontecem somente nos países em desenvolvimento, embora estes países consumam pouco mais de 20% da produção mundial de pesticidas. As estimativas nacionais indicam que 5.000 trabalhadores, anualmente, venham a óbito, vítimas dos pesticidas (SCATENA e DUARTE 2006).

A sintomatologia clínica, a determinação quantitativa de marcadores relacionados à exposição aos agrotóxicos e sua absorção pelo organismo devem ser considerados apenas parte dos aspectos a ser avaliados quando estudamos toxicidade. Além dos fatores extrínsecos que podem trazer prejuízos à população exposta aos OF, tais como grau e tempo de exposição, uso de Equipamentos de proteção Individual (EPI's) e hábitos e comportamentos adequados dos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

trabalhadores agrícolas, temos que fatores intrínsecos também podem estar interferindo no mecanismo das intoxicações, como por exemplo a variabilidade genética que a população apresenta.

A variabilidade genética individual tem impacto na resposta do organismo à exposição/absorção, bem como na regulação da resposta e metabolização e tempo de atuação da substância. A toxicogenômica é a área de pesquisa que toma por base o tempo de efeito das drogas sobre a expressão do gene, e é capaz de prever efeitos tóxicos mais cedo do que as tecnologias tradicionais, analisando as alterações nos biomarcadores do genoma que precedem os danos histológicos em órgãos. Alguns dos genes marcadores são específicos para determinados órgãos, e alguns deles são indicadores gerais de toxicidade em múltiplos órgãos (FABIAN G, et al. 2011).

Os genes alvo se baseiam em marcadores genéticos selecionados que codificam proteínas com funções diferentes, tais como: proteínas de resposta de fase aguda, do estresse inflamatório oxidativo, processos metabólicos, a regulação do ciclo celular/apoptose e enzimas que estão envolvidas e processos de desintoxicação. Genótipos específicos mostraram relação com diferenças aos danos no DNA, e estas surgem a partir das interações gene-ambiente em trabalhadores expostos ao OF (SINGH S., et al. 2011). Doenças resultantes de situação ocupacional foram listados na Pesquisa Nacional Ocupacional lista mestra da agenda de prioridades de pesquisa como as principais doenças e lesões ocupacionais (KESHAVA N. e ONG T.M. 1999).

A Paraoxanase-1 (PON1) é uma hidrolase de caráter cálcio dependente, e atua em diversos substratos, inclusive sobre a metabolização dos organofosforados, juntamente com a PON2 e a PON3, compõe a família das Paraoxanases.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

Apesar de possuírem estrutura e função semelhantes, visto que compõem a mesma família de enzimas, elas diferem quanto ao substrato nos quais atuam, e nos locais onde podem ser encontradas. A PON2 é encontrada apenas nos tecidos, se caracterizando como uma enzima intracelular estrita, enquanto a PON1 e a PON3 são encontradas predominantemente no plasma, associadas ao HDL. Quando ao substrato em que atuam, a PON1 tem afinidade pelos Organofosforados e algumas medicações, enquanto a PON2 e a PON3 tem afinidades para lactonas. As três enzimas possuem caráter antioxidante, sendo a mais potente delas a PON3 (KULKA, 2016). A PON1 merece destaque no contexto das intoxicações por Organofosforado porque, uma vez que esta enzima atua na metabolização dos OF aos quais o indivíduo foi exposto, estas substâncias não se ligarão às enzimas envolvidas no processo sináptico, no caso, as colinesterases, e elas poderão concluir suas funções perante a acetilcolina residual de forma eficaz, preservando a fenda sináptica (AKGUR et al, 2003).

Paralelo a este evento, a PON1 também está correlacionada com o estresse oxidativo, atuando juntamente com o colesterol de alta densidade (HDL), acoplado-se a esta molécula, e reduzindo as taxas de produção de radicais livres pelo organismo, inclusive durante a metabolização dos OF. Sabe-se que nas lipoproteínas de baixa densidade, como o LDL (Low Density Lipoprotein) e o VLDL (Very Low Density Lipoprotein), encontramos menos de 5% da atividade da PON1, e que o HDL possui uma estrutura chamada Apolipoproteína A-I que é responsável pela afinidade com a PON1, além de conferir a estabilidade que a enzima precisa para exercer suas funções (KULKA, 2016).

Levando-se em conta o alto grau de variabilidade genética que a população em geral possui, e que se manifesta nas diferentes características fenotípicas apresentadas, temos que a genética se apresenta como fator determinante para os indivíduos. Para o gene que codifica a enzima estudada (PON1), a literatura



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

descreve uma diversidade de polimorfismos. O SNP escolhido para este estudo foi selecionado levando em consideração a frequência com que ele aparece na população e, conseqüentemente, a variedade de literatura pré-existente nos bancos de dados internacionais (PUBMED), caracterizando o perfil dos pacientes que apresentam este polimorfismo como indivíduos possivelmente susceptíveis ou vulneráveis. Para a enzima PON1, o SNP escolhido foi o rs662.

2. OBJETIVOS

- Analisar o polimorfismo genético rs662(gene PON1) em trabalhadores rurais do município de Lagarto-SE (foram incluídos trabalhadores rurais dos municípios de Salgado e Boquim);
- Genotipar as amostras, utilizando primers e sondas específicos para o SNP pesquisado, através de PCR Real Time.

3. METODOLOGIA

População alvo

- Foram selecionados trabalhadores rurais adultos dos municípios de Lagarto, Salgado e Boquim - Sergipe.

Critérios de inclusão

- Trabalhador rural, produtora de laranja de um dos municípios estudados;
- Ser maior de 18 anos.
- Ter assinado o TCLE.

A técnica escolhida para avaliação da presença ou ausência do SNP foi o PCR em tempo real. A primeira etapa, foi a extração do DNA, que consiste na lise das membranas biológicas e purificação do material genético, e será realizada pela técnica de micropartículas magnéticas, através de automação, com o



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

equipamento m2000 sp da ABBOTT®. Nesse tipo de extração, após a solução de lise ser adicionada a amostra, o DNA é liberado do envoltório nuclear, e se liga às partículas magnéticas, que possuem afinidade pelo mesmo. Um sistema de ímã prende as partículas, de forma que as lavagens que o aparelho realiza na solução retirem todas as outras estruturas presentes na célula lizada, purificando a amostra de qualquer contaminante ou interferente. Em seguida, uma substância eluente quebra a ligação entre o DNA e as partículas magnéticas, e o material genético purificado e pronto para seguir a segunda etapa.

Uma vez extraído e purificado, a próxima etapa foi a genotipagem das amostras, utilizando primers e sonda específicos para o SNP pesquisado. O desenho dos primers previamente desenvolvidos pela empresa Thermo Scientific®, e foram adquiridos juntamente com a respectiva sonda, também previamente padronizada. Os primers marcam a região de interesse que se deseja pesquisar no DNA estudado, possuindo uma sequência iniciadora para a direção 5' – 3' para o primer Forward, e outra para o primer Reverse, na direção 3-5', já que as fitas têm que possuir nucleotídeos que sejam complementares. Uma vez reconhecendo a região complementar no DNA presente na amostra, o primer se liga à mesma, e a DNA polimerase, enzima responsável pela replicação do material genético, inicia o procedimento de duplicação das fitas.

O fundamento da técnica de PCR em tempo real consiste justamente em simular *in vitro* a replicação do DNA que ocorre *in vivo*, com oscilações de temperatura que promovem a desnaturação da fita dupla de DNA ($\pm 95^{\circ}\text{C}$), formando duas fitas simples, o anelamento dessas fitas com os primers e a posterior extensão ($\pm 60^{\circ}\text{C}$), onde uma fita gerará duas outras fitas, e a cada ciclo, essa replicação ganha um caráter logarítmico. Ao final de 40 ciclos, teremos milhares de cópias de DNA. A cada replicação, um sinal fluorescente é liberado pela sonda, que está acoplada ao primer, e esse sinal é captado pelo



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

equipamento e transformado em informação clínica, que no caso deste estudo, é representada pela presença dos genótipos estudados. O equipamento utilizado foi o Viia 7 da Thermo Scientific®.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Federal de Sergipe sob o número CAAE 12988313.6.0000.5546, de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Para a entrevista, cada paciente assinou o termo de consentimento livre e esclarecido. Todas as informações coletadas são confidenciais de modo que os nomes das pacientes entrevistadas não aparecerão em nenhum relatório ou artigo. As amostras de sangue total dos pacientes foram armazenadas de maneira adequada seguindo protocolo próprio, cada qual contendo um código correspondente, somente acessado pelos pesquisadores responsáveis. A identidade dos pacientes foi preservada, uma vez que códigos foram utilizados para fins de rotulação.

Análise Estatística

Após a construção do banco de dados com dupla entrada e posterior comparação de dados, a análise do desequilíbrio de ligação foi executada pelo programa HAPLOVIEW e expressa em r^2 . Na análise de associação do haplótipo e os valores de p foram calculados com o software THESIAS. Sempre que possível foi aplicados o *odds ratio* e intervalo de confiança (IC).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso inadequado de pesticidas na lavoura oferece riscos à saúde dos agricultores, com isso a contaminação pode ocorrer em qualquer etapa do



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

manuseio desses produtos (DYMINSKI, 2006). Esse efeito indesejado está relacionado ao uso de um dos compostos mais utilizados na agricultura, os organofosforados (OF), que podem levar a intoxicações a curto e longo prazo, especialmente no sistema neuropsicológico. As paraoxanases, em especial à PON1, tem como uma das funções a metabolização dos OFs e impedir que estes exerçam ação sobre as colinesterases.

Além da exposição ambiental aos agrotóxicos, a variabilidade genética exerce grande influência na resposta do indivíduo para com essas exposições. Prova disso, é que em alguns estudos foi observado que os genes que codificam as enzimas (como a PON1), são potenciais alvos de polimorfismos.

Foram genotipados 413 trabalhadores rurais do município de Lagarto- SE. O polimorfismo no gene da PON1(rs622) apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados da genotipagem dos trabalhadores rurais foram representados em valores percentuais de frequência dos genótipos.

Com relação ao rs662, o alelo T foi o mais frequente, se apresentando em heterozigose para a maioria do grupo estudo (48,4%), seguindo a seguinte sequência: CT>TT>CC. Dois estudos, um na Turquia e outro na China, demonstram outra ordem de apresentação genotípica (TT>CT>CC), provavelmente pelos diferentes perfis de ancestralidade que estas populações possuem em relação a brasileira. Porém, o alelo T é o mais frequente, tanto neste estudo, quanto nos continentes europeu e asiático (ZHANG et al.; SUNAY et al., 2013).

As frequências alélicas da amostra estão representadas na Tabela. 1, sendo que para esse polimorfismo não foram encontrados estudos com a população Yorubá, população escolhida como referência pelo perfil de ancestralidade (PENA, et al. 2011; SUAREZ-KURTZ, et al. 2012; SANTOS, et al. 2015; LIMA-COSTA, et al. 2015) dos trabalhadores rurais deste estudo.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Tabela 1. Distribuição das frequências Alélicas da amostra e da população Yorubá

TagSNP	Alelos	Frequência Alélica	Frequência Alélica (Yorubá)
rs662	C	0,48	0,21
	T	0,52	0,79

A frequência de distribuição entre os genótipos, utilizando o modelo aditivo-dominante-recessivo está descrita pela Tabela 2.

Tabela 2. Frequência de distribuição entre os genótipos nos modelos Aditivos – Dominantes e Recessivos

TagSNP	Alelo Associado	Modelo Genético	Alelos	N (%)
rs662	T	Aditivo	CC	93 (22,5)
			CT	200 (48,4)
			TT	120 (29,1)
		Dominante	CC	93 (22,5)
			CT + TT	320 (77,5)
		Recessivo	CC+ CT	293 (70,9)
			TT	120 (29,1)

A atividade de BChE foi relacionada com os genótipos, e apresentou associação estatisticamente significativa e com um *Odds Ratio* de 3,152 (1,07 – 9,32) para o SNP rs662, polimorfismo presente no gene da PON1 no modelo genético recessivo, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Associação entre os genótipos nos modelos Aditivos-Dominante e Recessivos



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

TagSNP	Alelo Associado	Modelo Genético	Alelos	BChE Normal	BChE Reduzida	Valor de p	Odds Ratio
rs662	T	Aditivo	CC	73 (21,9)	2 (14,3)	0,093**	(-)
			CT	166 (48,3)	4 (28,6)		
			TT	99 (29,7)	8 (57,1)		
		Dominante	CC	73 (21,9)	2 (14,3)	0,742*	(-)
			CT + TT	260 (78,1)	12 (85,7)		
		Recessivo	CC+CT	234 (70,3)	6 (42,9)	0,039*	3,152***
			TT	99 (29,7)	8 (57,1)		

*Teste Exato de Fisher

**Modelo de Regressão Logística Binária

***Pearson qui-Quadrado

5. CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados, conclui-se que há uma maior prevalência do alelo T, em relação ao rs662 (gene *PON1*). Quando foi testada a associação entre a atividade de BChE e os genótipos, essa foi estatisticamente significativa para o rs662 (gene *PON1*), no modelo recessivo.

6. PERSPECTIVAS

Um estudo de caráter longitudinal poderá expressar melhor esta relação, correlacionando com os valores basais da BChE e estimando a perda de atividade pós-exposição ao OF. Assim como, a análise de SNPs de outros genes candidatos são necessários para entender melhor o fundo genético relacionado à intoxicação por OF.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2006. Sistema de informações sobre agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13 dez/2011.

AKGÜR, S.a et al. Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorous insecticide poisoning. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 133, n. 1-2, p.136-140, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738\(03\)00060-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0379-0738(03)00060-4).

ALMEIDA L.M.; PAULILLO L. F. A relevância da citricultura na demanda de trabalho agrícola no Estado de São Paulo. In: _____ PAULILLO et al. (Coord.). Agroindústria no Brasil: diferenças e dominância. Rio de Janeiro: Papers, 2006. cap.5, p.180.

ALLDERDICE, P.W.; GARNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N., MCALPINES, J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*, San Diego, v.11, n.2, p.452-454, 1991.

ANDREOLI, C. V. et al. Avaliação dos níveis de agrotóxicos encontrados na água de abastecimento nas regiões de Curitiba e Londrina. *Revista Técnica da Sanepar: SANARE*, 2000. v.12, n. 12.

BARBOSA, L. C. Pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV, 2004. p. 57- 106.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

BRASIL, 1997. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Organização Pan-Americana de Saúde/Organização Mundial de Saúde. Brasília).

BRASIL, 1989. Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da União, Brasília, p. 15-53, 11 jul. 1989. Seção I.

BROOMFIELD, C.A.; MAXWELL, D.M.; SOLANA, R.P.; CASTRO, C.A.; FINGER, AV; LENZ, DE. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics, Baltimore, v.259, n.2, p.633-638, 1991.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. The Biochemical Journal, Londres, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

CHIA SE, MOHAMED ALI S, YAP PH, GAN L, ONG YB, CHIA KS. Distribution of PON1 polymorphisms PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate exposure. Neurotoxicology. 2009 Mar;30(2):214-9. Epub 2008 Dec 24.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. Turkish Journal of Biochemistry, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nature Reviews. Neuroscience, Londres, v.4, n.2, p.131-138, 2003.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

DOMINGUES. M. R. et al. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. Londrina, v. 25, p. 45-54, dez. 2004.

DUYSEN, E.G.; LI, B.; DARVESH, S.; LOCKRIDGE, O. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (-)-huperzine A and donepezil suggests humans with butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. Toxicology, Amsterdã, v.233, n.1-3, p.60-69, 2007.

DYMINSKI A. S. Contaminação de solos e águas subterrâneas. Universidade Federal do Paraná. Aula Técnica 019. Dezembro de 2006 .Disponível em:http://www.cesec.ufpr.br/docente/andrea/TC019_Contaminacao_de_solos.pdf Acesso em: 13 dez/2011.

FABIAN G., FARAGO N., FEHER L.Z., NAGY L.I., KULIN S., KITAJKA K., BITO T., TUBAK V., KATONA R.L., TISZLAVICZ L., PUSKAS L.G.High-Density Real-Time PCR-Based in Vivo Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity.Int J Mol Sci. 2011;12(9):6116-34. Epub 2011 Sep 19.

GIRARD, E; BERNARD, V.; MINIC, J.; CHATONNET, A.; KREJCI, E.; MOLGÓ J. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice. Life Sciences, Oxford, v.80, n.24-25, p.2380–2385, 2007.

GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE JR., C.W. Pseudocholinesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. Nature, Londres, v.299, n.5882, p.439-442, 1982.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Agrícola. Setembro de 2011. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201109.pdf Acesso em: 13 dez/2011.

JBILLO, O.; BARTELS, C.F.; CHATONNET, A.; TOUTANT, J.P.; LOCKRIDGE, O. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicon*, Nova Iorque, v.32, n.11, p.1445-1457, 1994.

KESHAVA N., ONG T.M. Occupational exposure to genotoxic agents. *Mutat Res.* 1999 Sep;437(2):175-94.

KULKA, M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic application. **Polish Journal Of Veterinary Sciences.** p. 225-232. dez. 2016.

LEE, L.G., CONNELL, C.R. and W. Bloch. Allelic Discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993. 21: 3761-3766.

LI, B.; STRIBLEY, J.A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L.M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, Londres, v.75, p.1320-1331, 2000.

LIMA-COSTA MF, RODRIGUES LC, BARRETO ML, GOUVEIA M, HORTA BL, MAMBRINI J, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). Sci Rep [Internet]. 2015;5(1):9812. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep09812>

LOPES, T. M. N. Avaliação de pesticidas em água utilizada para o consumo humano no município de Dourados (MS). 2006. 161 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience, Oxford, v.110, n.4, p.627-639, 2002.

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. Biochemical and Biophysical Research Communications, Nova Iorque, v.189, n.3, p.1280-1286, 1992.

NEVES E. M.; DAYOUB M.; DRAGONE D. S. Análise da demanda por defensivos agrícolas pela fruticultura brasileira 1997 – 2000. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 24, n. 3, dez. 2002.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. Acta Medica, Hradec Králové, v.47, n.4, p.215-228, 2004.

PENA SDJ, DI PIETRO G, FUCHSHUBER-MORAES M, GENRO JP, HUTZ MH, KEHDY F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. PLoS One.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

2011;6(2).

QUINN D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. Chemical Reviews, Washington, v.87, p.955-979, 1987.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia, 4^aed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.110, 2001.

ROSE R.L., TANG J., CHOI J., CAO Y., USMANI A., CHERRINGTON N., HODGSON E. Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. Scand J Work Environ Health. 2005;31Suppl 1:156-63; discussion 119-22.

SANCHES S.M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p.53-58, jan./dez. 2003.

SANTOS HC, HORIMOTO AVR, TARAZONA-SANTOS E, RODRIGUES-SOARES F, BARRETO ML, HORTA BL, et al. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. Eur J Hum Genet [Internet]. 2016;24(5):725–31. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejhg.2015.187>

SCATENA L. M. ; DUARTE R. G. Como o produtor rural usa agrotóxicos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n. 2, p.191 – 194, 2006.

SCHWARZ, M.; GLICK, D.; LOEWENSTEIN, Y.; SOREQ, H. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

administration of various drugs and poisons. Pharmacology and Therapeutics, Oxford, v.67, n.2, p.283-322, 1995.

SINDAG- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola ,2006. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/>. Acesso em: 13/dez/2011.

SINGH S., KUMAR V., SINGH P., THAKUR S., BANERJEE B.D., RAUTELA R.S., GROVER S.S., RAWAT D.S., PASHA S.T., JAIN S.K., RAI A. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. Mutat Res. 2011 Oct9;725(1-2):36-42. Epub 2011 Jun 28.

SMALL, D.H.; MICHAELSON, S.; SBERNA, G. Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease. Neurochemistry International, Oxford, v.28, n.5-6, p.453-483, 1996.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. Nature Reviews. Neuroscience, Londres, v.2, n.4, p.294-302, 2001.

SOUZA. A. Singularidades do mercado frutas cítricas. Toda Fruta, 2005.

Disponível em

<http://www.todafruta.com.br/portal/icNoticiaAberta.asp?idNoticia=9073> Acesso em: 13/dez/2011.

STOPELLI, I.; M .A. Agricultura, ambiente saúde e : uma abordagem sobre o risco de contato com os agrotóxicos a partir de um registro hospitalar de referência



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

regional. (Tese Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, 2005.

SUAREZ-KURTZ G, PENA SDJ, STRUCHINER CJ, HUTZ MH. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: Influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol*. 2012;3 NOV(November):1–7.

SUNAY SZ, KAYAALTI Z, BAYRAK T, SÖYLEMEZOĞLU T. Effect of paraoxonase 1 192 Q/R polymorphism on paraoxonase and acetylcholinesterase enzyme activities in a Turkish population exposed to organophosphate. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2015;31(12):1061–8. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233713487246>

VIEIRA A. C. Aspectos técnicos da produção citrícola no Brasil. In: PAULILLO et al.(Coord.). *Agroindústria no Brasil: diferenças e dominância*. Rio de Janeiro: Papers,2006. cap 7, p. 295.

YUCESoy B., JOHNSON V.J. Genetic variability in susceptibility to occupational respiratory sensitization. *J Allergy (Cairo)*. 2011;2011:346719. Epub 2011 Jun 12.

ZHANG X, SUI H, LI H, ZHENG J, WANG F, LI B, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in northern Han Chinese workers exposed to organophosphate pesticides. *Exp Biol Med* [Internet]. 2014;239(2):232–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213513983>



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

8. OUTRAS ATIVIDADES

Os dados coletados na estação de anamnese em formulários eletrônicos foram migrados eletronicamente para planilhas do tipo Microsoft® excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx). Para migração dos dados coletados na estação de coleta de sangue, posteriormente a coleta os valores obtidos foram tabulados em planilha do tipo Microsoft® Excel® 2011 for MAC versão 14.3.2 no formato (xlsx) utilizando dupla digitação e posterior “data compare”, desta forma checando a consistência da migração.

Este trabalho foi dividido entre as análises descritivas, análise de variáveis contínuas e categóricas, na qual foram analisados as características sociodemográficas e econômicas (faixa etária, gênero, cor da pele, local de residência, grau de instrução e classe socioeconômica - segundo o Critério de Classificação Econômica Brasil – CCEB, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – ABEP - APÊNDICE C), e genotipagem dos trabalhadores rurais para o SNP estudado.